



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารแอลฟาแมงโกสติน
ด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์จากรา

โดย ผศ.ดร.พนารัตน์ อรุณรัตติยากร และคณะ

ธันวาคม 2556

สัญญาเลขที่ MRG5480126

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารแอลฟาแมงโกสติน
ด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์จากรา

ดร.พนารัตน์ อรุณรัตติยากร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5480126

ชื่อโครงการ: การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารแอลฟาแมงโกสติน ด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์จากรา

ชื่อนักวิจัย : ดร. พนารัตน์ อรุณรัตติยากร

E-mail Address : panarata@swu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารแอลฟาแมงโกสติน(1) ด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์จากราเอนโดไฟต์ 3 ชนิดคือ *Colletotrichum* sp.MT02 *Xylaria* sp.GM06 และ *Phomopsis* sp.K12 เมื่อทำปฏิกิริยาแอลฟาแมงโกสตินร่วมกับรา *Colletotrichum* sp. MT02 สามารถแยกสารอนุพันธ์ได้สองชนิดคือ 17,18-dihydroxymangostanin (2) และ cyclomangostanin (3) ขณะที่ปฏิกิริยาแอลฟาแมงโกสตินกับรา *Phomopsis* sp. K12 ให้สารอนุพันธ์อีก 3 ชนิด คือ 12,13,20-trihydroxymangostin (4) 12,13,19-trihydroxymangostin (5) และ 20-hydroxymangostanin (6) ส่วนสารอนุพันธ์อีก 2 ชนิด ซึ่งแยกได้จากการปฏิกิริยาแอลฟาแมงโกสตินร่วมกับ *Xylaria* sp. GM06 นั้นยังไม่สามารถสรุปโครงสร้างได้ในขณะนี้ โครงสร้างสารที่รายงานในงานวิจัยนี้ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทสโคปี ซึ่งได้แก่ NMR HRMS และ IR ส่วนสาร 3 ยังยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค X-ray crystallographic analysis จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์ พบว่าสารอนุพันธ์ทุกชนิดไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อวัณโรค และไม่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเต้านม (MCF7 cell line) ยกเว้นสาร 4 และ 5 มีฤทธิ์เล็กน้อยในการต้านมะเร็งเต้านม (MCF7 cell line)

Keywords : Biotransformation, α -mangostin, *Colletotrichum* sp. MT02, *Xylaria* sp. GM06, *Phomopsis* sp. K12

Abstract

Project Code : MRG5480126**Project Title** : Biotransformation of α -mangostin by fungi**Investigator** : Dr. Panarat Arunrattiyakorn**E-mail Address** : panarata@swu.ac.th**Project Period** : 2 years

The microbial transformation of α -mangostin (**1**) by three endophytic fungi *Colletotrichum* sp. GM02, *Xylaria* sp. GM06 and *Phomopsis* sp. K12 resulted in the production of seven metabolites. Biotransformation with *Colletotrichum* sp. GM02 converted **1** into 17,18-dihydroxymangostanin (**2**) and cyclomangostanin (**3**), while incubation with *Phomopsis* sp. K12, 12,13,20-trihydroxymangostin (**4**), 12,13,19-trihydroxymangostin (**5**) and 20-hydroxymangostanin (**6**) were obtained as transformation products. Transformation of **1** with *Xylaria* sp. GM06 led to isolation of two products with their structures could not completely identify yet. The structures of these metabolites were elucidated via spectroscopic analyses (NMR, HRMS and IR) and for compound **3** the structure was confirmed by X-ray crystallographic analysis. Among these products, **4** and **6** showed weakly cytotoxic activity breast cancer (MCF7) cell line.

Keywords : Biotransformation, α -mangostin, *Colletotrichum* sp. MT02, *Xylaria* sp. GM06, *Phomopsis* sp. K12

Executive Summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เมื่อไม่นานมานี้ได้มีข่าวประชาสัมพันธ์จากองค์การอาหารและยาของไทย ในการเตือนผู้บริโภคไม่ให้มีการหลงเชื่อสรรพคุณที่อ้างเกินจริงเกี่ยวกับประสิทธิภาพของการดื่มน้ำสกัดสมุนไพรเข้มข้นบางชนิด เนื่องจากยังไม่มีผลการทดลองทางการแพทย์มายืนยัน จากการขาดผลการวิจัยมารับรองนี้เองที่ทำให้เป็นข้อจำกัดในการผลิตน้ำสกัดสมุนไพรเหล่านี้เป็นอาหารเสริมสุขภาพอย่างถูกกฎหมายได้ ถึงแม้จะมีการศึกษาถึงฤทธิ์ต่างๆ ของสารสำคัญในน้ำสมุนไพรเหล่านั้นมาบ้างแล้ว แต่การนำน้ำสมุนไพรนี้มาบริโภคในเชิงอาหารเสริมสุขภาพ ยังต้องการผลการวิจัยอ้างอิงอีกหลายๆ ด้าน รวมถึงการศึกษาเกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของสารสำคัญต่างๆ จากสมุนไพร ในร่างกายของเรา เพื่อให้ทราบถึงประโยชน์และโทษของสารนั้นเมื่อร่างกายได้รับเข้าไป

การศึกษาเมตาบอลิซึมของสารต่างๆ มีหลายวิธีเช่น การศึกษาโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงหรือการใช้สัตว์ทดลอง ซึ่งการศึกษาดังกล่าวมีข้อจำกัดเกี่ยวกับค่าใช้จ่ายในการศึกษา ความชำนาญพิเศษในการศึกษา และจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง รวมถึงความเป็นพิษของสารที่ทดสอบทำให้ไม่สามารถให้สารทดสอบในปริมาณมากกับสัตว์ทดลองได้ ทำให้ได้สารเมตาบอไลต์ต่างๆ ในปริมาณน้อย จึงเกิดข้อจำกัดในการแยกและวิเคราะห์โครงสร้างสาร รวมถึงการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเหล่านั้นด้วย อีกทางเลือกหนึ่งในการศึกษาเมตาบอลิซึมของสารคือการใช้จุลินทรีย์ ซึ่งในการศึกษาสามารถใช้จุลินทรีย์ได้หลายชนิดทำให้ได้เมตาบอไลต์ที่หลากหลาย ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก ทำการเพิ่มปริมาณการทดสอบได้ง่าย ส่วนจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ศึกษา สามารถใช้ได้ทั้งแบคทีเรียและรา แต่เนื่องจากราจัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตเช่นเดียวกับสัตว์และมนุษย์ จึงมีระบบของเอนไซม์ที่มีความใกล้เคียงกับมนุษย์มากกว่า เราจึงนิยมใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาเมตาบอลิซึมของสารต่างๆ

สำหรับงานวิจัยนี้ กลุ่มผู้วิจัยสนใจศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์จากมังคุด โดยสารสำคัญที่พบมากในมังคุดคือ แอลฟาแมงโกสติน ซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่ม prenylated xanthone โดยมีรายงานว่าสารนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจมากมาย เช่นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านเชื้อไวรัส โรค ต้านเชื้อมาเลเรีย และมีแนวโน้มในการต้านการเจริญของมะเร็งบางชนิด เป็นต้น ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงสนใจทำการศึกษามетаบอลิซึมของแอลฟาแมงโกสตินโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยคาดว่าวิธีการนี้จะเป็นวิธีการหนึ่งในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของแอลฟาแมงโกสติน ทำให้ได้อนุพันธ์ที่หลากหลาย หรืออาจเป็นสารใหม่หรือเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การทราบถึงวิถีเมตาบอลิซึมของสารนี้โดยเชื้อรา อาจใช้เป็นต้นแบบการศึกษาเมตาบอลิซึมของสารนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่อไปได้

จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ของผู้วิจัย ได้ทำการศึกษามетаบอลิซึมของแอลฟาแมงโกสตินโดยอาศัยปฏิกิริยาจากเอนไซม์ของเชื้อราที่แยกได้ต้นยานาง คือ *Colletotrichum gloeosporioides* (EYL131) และ *Neosartorya spathulata* (EYR042) จากการเลี้ยงร่วกับสารแอลฟาแมงโกสติน ทำให้สามารถแยกเมตาบอไลต์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของแอลฟาแมงโกสตินที่เป็นสารใหม่ได้ 4 ชนิด คือ mangostin 3-sulfate (1), mangostanin 6-sulfate (2), 17,18-dihydroxymangostanin 6-sulfate (3) and isomangostanin 3-sulfate (4) โดยสาร 1 มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสารตั้งต้นแอลฟาแมงโกสติน [1] จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า วิธีการทดลองนี้มีประสิทธิภาพดีในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร ทำให้ได้สารใหม่และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น สามารถศึกษาถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างสารกับการออกฤทธิ์ มีประโยชน์ต่อการพัฒนาในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์อื่นต่อไป และเนื่องจากยังไม่มีรายงานจากกลุ่มผู้วิจัยอื่นในการศึกษาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารแอลฟาแมงโกสตินโดยวิธีทางชีวภาพ ดังนั้น

กลุ่มผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้สารที่หลากหลายมากขึ้น และจากการวิจัยอย่างต่อเนื่องของผู้วิจัยในการทดสอบหาสารที่มีประสิทธิภาพในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของแอลฟาแมงโกสติน พบว่าจากการทดสอบปฏิกิริยาเบื้องต้น พบราเอนโดไฟท์ 2 ชนิดที่แยกได้จากส่วนใบของต้นมังคุดคือเชื้อราไอโซเลต GM02 และ GM06 สามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างของแอลฟาแมงโกสตินได้ ซึ่งราสองสายพันธุ์นี้ให้อนุพันธ์ของแอลฟาแมงโกสตินที่ต่างกัน และต่างจากสารอนุพันธ์เดิมทั้ง 4 ชนิด (สาร 1–4) ที่ได้กล่าวไปแล้วในขั้นต้น (ผลจาก TLC และ HPLC) ดังนั้นผู้วิจัยสนใจที่จะทำการขยายขนาดของปฏิกิริยาเพื่อสกัดแยกสารอนุพันธ์ ทำบริสุทธิ์ และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสนใจทดสอบปฏิกิริยาเพิ่มเติมจากราอื่นๆ ต่อไปด้วย

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 เพื่อศึกษาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของแอลฟาแมงโกสติน โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์จากราเอนโดไฟท์ GM02 และ GM06 ที่แยกได้จากส่วนใบของต้นมังคุด และคัดเลือกราเอนโดไฟท์ชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม โดยใช้ใบของมะกอกเป็นแหล่งคัดแยกเอนโดไฟท์

2.2 สกัด และแยกองค์ประกอบทางเคมีที่เกิดจากการปรับเปลี่ยนของราให้บริสุทธิ์

2.3 เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์ที่ราสังเคราะห์ขึ้นเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น

2.4 วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสูตรโครงสร้างของสารประกอบกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 ทำการคัดแยกสารแอลฟาแมงโกสตินจากเปลือกของมังคุด

3.2 ทำการเตรียมราที่ใช้ในปฏิกิริยา

3.2.1 ทำการเพิ่มปริมาณราเอนโดไฟท์ ไอโซเลต GM02 และ GM06

3.2.2 ทำการคัดแยกราเอนโดไฟท์จากส่วนใบของมะกอกโอสไฟ แล้วนำราที่แยกได้มาทดสอบเพิ่มเติมเพื่อคัดเลือกราที่มีประสิทธิภาพในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารแอลฟาแมงโกสตินได้

3.3 ทำการขยายขนาดปฏิกิริยาโดยการเลี้ยงราในข้อ 3.2 ร่วมกับสารแอลฟาแมงโกสติน

3.4 นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากปฏิกิริยาในข้อ 3.3 มาสกัดแยกสารอนุพันธ์ของแอลฟาแมงโกสติน ทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (NMR, MS, IR)

3.5 นำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เปรียบเทียบกับสารตั้งต้น และวิเคราะห์ผลหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสูตรโครงสร้างและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

4. แผนการดำเนินงานตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

กิจกรรม	ปีที่ 1		ปีที่ 2		ผลที่คาดว่าจะได้รับ
	เดือนที่ 1-6	เดือนที่ 7-12	เดือนที่ 13-17	เดือนที่ 18-24	
1. ทำการเตรียมราไอโซเลต GM02 และ GM06 และคัดแยกราเพิ่มเติมจากส่วนใบของมะกอกโอลิฟ	↔				- ได้เชื้อราที่พร้อมในการทำปฏิกิริยา
2. ทำการเตรียมสารบริสุทธิ์แอลฟาแมงโกสติน	↔				- ได้สารบริสุทธิ์แอลฟาแมงโกสติน
3. ทำการทดสอบปฏิกิริยาเบื้องต้นโดยการเลี้ยงราร่วมกับแอลฟาแมงโกสติน	↔	↔			- ได้เชื้อราที่สามารถใช้แอลฟาแมงโกสตินเป็นสารตั้งต้นและเกิดเป็นอนุพันธ์จากปฏิกิริยา
4. ทำการขยายขนาดปฏิกิริยา เพื่อคัดแยกอนุพันธ์ที่ได้		↔	↔		- ได้ทราบโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์และทราบถึงปฏิกิริยาที่เกิด
5. ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารผลิตภัณฑ์ที่แยกได้			↔	↔	- ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตั้งต้นและสารอนุพันธ์ที่แยกได้
6. ทำการทดสอบหาสายพันธุ์ของราที่ใช้ในปฏิกิริยา			↔	↔	- ทราบชนิดของเชื้อราที่ใช้ทำปฏิกิริยา
7. รวบรวมสรุปและเขียนรายงานวิจัยผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ				↔	- เป็นการเผยแพร่ผลงานวิจัยให้กับผู้ที่สนใจต่อไป

5. ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

ชื่อผลงานที่จะตีพิมพ์ คาดว่าจะเป็น Biotransformation of α -mangostin

วารสารที่จะตีพิมพ์ได้ คาดว่าจะเป็น Journal of natural products (มี impact factor 3.285) หรือ Phytochemistry (มี impact factor 3.050) Journal of Molecular Catalysis B (มี impact factor 2.823)

6. งบประมาณโครงการ

รายการค่าใช้จ่าย	ปีที่ 1 (บาท)	ปีที่ 2 (บาท)
1. หมวดค่าตอบแทนนักวิจัย ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน	120,000	120,000
2. หมวดค่าวัสดุ สารเคมีและเครื่องแก้ว ค่าพีซีที่ใช้ในการทดลอง วัสดุสำนักงาน	101,000 2,000 2,000	83,000 2,000
3. หมวดค่าใช้สอยและอื่นๆ - ค่าใช้จ่ายเบ็ดเตล็ดและค่าไปรษณีย์ - ค่าใช้จ่ายในการเดินทางเพื่อทำวิจัย ภายในประเทศ - ค่าจ้างเหมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ(MS) - ค่าจ้างเหมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ - ค่าจ้างเหมาวิเคราะห์ระบุสายพันธุ์ของรา	2,000 3,000 10,000 - -	2,000 - 10,000 20,000 3,000
รวมงบประมาณโครงการ	240,000	240,000

งบประมาณรวม 2 ปี **480,000** บาท (สี่แสนแปดหมื่นบาทถ้วน)

เนื้อหางานวิจัย

วัตถุประสงค์

ทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารแอลฟาแมงโกสตินโดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์จากรา 3 ชนิดคือ *Colletotrichum* sp. GM02, *Xylaria* sp. GM06 และ *Phomopsis* sp. K12 เพื่อแยกและหาโครงสร้างสารอนุพันธ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา พร้อมทั้งศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเหล่านี้ด้วย

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

- Optical rotations ใช้เครื่อง a Jasco P-2200 digital polarimeter
- UV spectra ตรวจสอบด้วยเครื่อง Shimadzu UV-2450 PC spectrophotometer.
- IR spectra วิเคราะห์ด้วยเครื่อง PerkinElmer FT-IR Spectrum BX spectrophotometer.
- ^1H NMR (300 MHz), ^{13}C NMR (75 MHz) และ 2D NMR spectra วิเคราะห์ด้วยเครื่อง AVANCE 300 FT-NMR spectrometer
- ^1H (600 MHz) and ^{13}C (151 MHz) NMR spectra วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Varian NMR System spectrometer.
- Mass spectra ได้ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Bruker MicrOTOF II spectrometer using electrospray ionization (ESI) source in negative-ion mode
- X-ray single-crystal diffraction ตรวจสอบด้วยเครื่อง Bruker AXS XRD
- Sephadex LH-20 ได้จาก Amersham Pharmacia Biotech
- TLC วิเคราะห์ด้วย Si gel 60 F542s (Merck)
- HPLC วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Waters[®] 600 controller และมีตัวตรวจสอบเป็น Waters[®] 486 Tunable Absorbance Detector (USA) ใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 column (5 μm , 20x250 mm; (GL Sciences)

2. การเตรียมสารแอลฟาแมงโกสติน

- 1.1 นำเปลือกมังคุดมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วทำการอบแห้ง
- 1.2 แช่เปลือกมังคุดอบแห้งในตัวทำละลายอินทรีย์เอธิลอะซีเตตเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง
- 1.3 ทำการกรองเพื่อแยกของแข็งออก และทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน จนได้เป็นสารสกัดจากเปลือกมังคุด
- 1.4 ทำการแยกเอาสารแอลฟาแมงโกสตินซึ่งเป็นสารหลักในสารสกัดจากเปลือกมังคุด โดยนำสารสกัดจากข้อ 1.3 มาผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ ทำการชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน/ เฮกเซน-อะซีโตน/ อะซีโตน/ อะซีโตน-เมทานอล และ เมทานอล ตามลำดับ ในอัตราส่วนต่างๆ โดยเป็นการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายขึ้นตามลำดับ
- 1.5 ตรวจสอบสารที่ถูกชะจากคอลัมน์ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่าสารแอลฟาแมงโกสตินถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย เฮกเซน : อะซีโตน เท่ากับ 8:2 ดังนั้นจึงรวบรวม fraction ต่างๆ ที่มีสารแอลฟาแมงโกสตินอยู่ แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน จากนั้นนำสารที่ได้มาตกผลึกซ้ำในอะซีโตน จะได้เป็นสารบริสุทธิ์แอลฟาแมงโกสติน ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ด้วย NMR เพื่อดูความบริสุทธิ์และยืนยันชนิดของสารที่แยกได้โดยการเทียบผล NMR กับรายงานก่อนหน้า

3. การแยกราเอ็นโดไฟต์จากส่วนใบของมะกอกโอลีฟ

- 3.1 นำใบที่สมบูรณ์ของมะกอกโอลีฟ (*Olea europaea*. L)(เก็บตัวอย่างพืชเมื่อ ตุลาคม 2011 ที่ เมืองโอคายามา ประเทศ ญี่ปุ่น) มาล้างด้วยน้ำเปล่าให้สะอาด ทำการตัดส่วนใบให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 0.5x0.5 ตารางเซนติเมตร
- 3.2 นำชิ้นส่วนของพืชมาแช่ใน 70 % (v/v) เอทานอล เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยการแช่ใน 3% (v/v) sodium hypochlorite เป็นเวลา 90 วินาที และแช่ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ อีกเป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ
- 3.3 ทำการขูดชิ้นส่วนพืชให้แห้งบนกระดาษกรอง แล้ววางชิ้นส่วนพืชลงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่ 28 °C เป็นเวลา 3-7 วัน จนสังเกตเห็นการเจริญของเส้นใยรา
- 3.4 ทำการแยกราที่เจริญจากส่วนของใบ จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งจากการทดลองสามารถแยกเชื้อราได้ 25 ไอโซเลต และจากการจัดชนิดของราโดยอาศัยการสังเกตจากลักษณะภายนอก สามารถจัดราที่แยกได้ 25 ไอโซเลต เป็น 15 กลุ่มชนิดของรา นำเชื้อราเพียง 1 ไอโซเลตจากแต่ละกลุ่ม (คือ 15 ไอโซเลต) มาทำการศึกษาขั้นต่อไป

4. การทดสอบปฏิกิริยาเบื้องต้นเพื่อหาราที่แยกได้จากใบของมะกอกโอลีฟที่สามารถเมตาบอลิ์สารแอลฟาแมงโกสทินได้

- 4.1 นำราทั้ง 15 ไอโซเลต ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่ 28 °C เป็นเวลาสองสัปดาห์
- 4.2 ทำปฏิกิริยาโดยการหมักเชื้อรา แต่ละชนิด ร่วมกับสารแอลฟาแมงโกสทิน โดยตัดเชื้อเป็นชิ้นขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 1 ชิ้น ใส่ในอาหารเหลวปริมาตร 25 มิลลิลิตร (อาหารเหลวประกอบด้วย sucrose (30 g), NaNO₃ (3 g), K₂HPO₄ (1 g), MgSO₄·7 H₂O (0.5 g), KCl (0.5 g), FeSO₄·7 H₂O (0.01 g) ในน้ำ 1 ลิตร pH 7.2) ทำการเลี้ยงเชื้อที่ 28°C เขย่า 125 rpm เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงเติมสารละลายแอลฟาแมงโกสทิน 100 ไมโครลิตร (จาก stock 10 mg/mL ในอะซีโตน) แล้วทำการเลี้ยงต่อด้วยสภาวะเดิมอีกเป็นเวลา 5 วัน

หมายเหตุ เชื้อแต่ละชนิดต้องทำปฏิกิริยาควบคุม ซึ่งปฏิกิริยาควบคุมประกอบด้วย

ควบคุม 1: เชื้อรา + อาหาร และทำการบ่มที่สภาวะเดียวกับการทดสอบปฏิกิริยาแต่ไม่มีการเติมสารแอลฟาแมงโกสทิน (ปฏิกิริยาควบคุมแบบไม่มีสารตั้งต้น)

ควบคุม 2: สารแอลฟาแมงโกสทิน + อาหาร และทำการบ่มที่สภาวะเดียวกับการทดสอบปฏิกิริยาแต่ไม่มีการใส่เชื้อ (ปฏิกิริยาควบคุมแบบไม่มีเชื้อรา)

- 4.3 เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด นำทั้งปฏิกิริยาการหมักสารแอลฟาแมงโกสทินกับรา และปฏิกิริยาควบคุม มาทำการกรองแยกเชื้อออก
- 4.4 ทำการสกัดของเหลวที่กรองได้ ด้วยเอธิลอะซีเตต แล้วกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดันจนได้เป็นสารสกัด
- 4.5 นำสารสกัดที่ได้มาตรวจหาสารอนุพันธ์ของสารแอลฟาแมงโกสทินที่เกิดจากการหมัก โดยการเปรียบเทียบโครมาโทแกรมระหว่าง บนแผ่น TLC โดยการเทียบระหว่าง
 - สารแอลฟาแมงโกสทิน (สารตั้งต้น)
 - ปฏิกิริยาควบคุมที่ 1 และ 2
 - ปฏิกิริยาการหมักสารแอลฟาแมงโกสทินกับเชื้อราแต่ละชนิด

จากการเปรียบเทียบ TLC chromatogram ของปฏิกิริยาการหมักและปฏิกิริยาควบคุม พบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาการหมักของสารแอลฟาแมงโกสตินกับราเอนโดไฟต์ไอโซเลต K12 ซึ่งสารใหม่ที่เกิดขึ้นมีค่า Rf ต่างจากสารอื่นๆ ที่พบในปฏิกิริยาควบคุมทั้งสองรวม อีกทั้งยังพบว่าปริมาณสารแอลฟาแมงโกสตินมีเหลืออยู่ในปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อย จึงเลือกเชื้อไอโซเลต K12 มาทำการศึกษาต่อไปโดยการขยายขนาดปฏิกิริยาเพื่อแยกสารอนุพันธ์ให้ได้ปริมาณเพียงพอต่อการหาโครงสร้างสาร

5. จากการทดลองก่อนหน้านี้ ได้ทำการคัดแยกราเอนโดไฟต์จากส่วนใบของมังคุด และทำการทดสอบปฏิกิริยาเบื้องต้นเพื่อหาสารที่สามารถใช้สารแอลฟาแมงโกสตินเป็นสารตั้งต้นได้ (วิธีการเช่นเดียวกับ ข้อ 3 และ 4 แต่เปลี่ยนใบไม้จากใบของมะกอกโอลิฟเป็นใบของมังคุด) และพบว่าราเอนโดไฟต์ไอโซเลต GM02 และ GM06 สามารถใช้สารแอลฟาแมงโกสตินเป็นสารตั้งต้นได้และเกิดสารใหม่ขึ้นในปฏิกิริยาการหมัก จึงคัดเลือกทั้งสองมาทำการขยายขนาดปฏิกิริยาต่อไป

6. ทำการขยายขนาดของปฏิกิริยา เพื่อแยกและหาโครงสร้างสารอนุพันธ์

6.1 ทำการเลี้ยงราที่คัดเลือกไว้ คือ ราไอโซเลต GM02 GM06 จากส่วนใบมังคุด และ ราไอโซเลต K12 จากส่วนใบมะกอกโอลิฟ บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่ 28 °C เป็นเวลาสองสัปดาห์

6.2 ทำการเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิดในอาหารเหลว 150 มิลลิลิตร จำนวน 20 ขวด รวมปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 ลิตร (อาหาร และสภาวะในการเลี้ยง เช่นเดียวกับที่อธิบายในขั้นตอนที่ 4) ทำการเลี้ยง 3 วัน หลังจากนั้นเติมสารละลายแอลฟาแมงโกสติน 400 ไมโครลิตรต่อขวด (15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอะซิโตน) หลังจากนั้นทำการเลี้ยงต่ออีก 7 วัน แล้วทำการกรองน้ำเลี้ยงเชื้อ ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซีเตต และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยลดความดัน จนได้สารสกัดหยาบ ทำการแยกสารอนุพันธ์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี

7. ทำการแยกและการหาโครงสร้างสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

7.1 การแยกสารอนุพันธ์จากการบ่มสารแอลฟาแมงโกสตินกับเชื้อราไอโซเลต GM02

นำสารสกัดของปฏิกิริยาที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต GM02 (315 mg) มาแยกด้วย Sephadex LH-20 chromatography โดยใช้ตัวชะเป็น ethanol-water (50:50, v/v) จะสามารถแยกสารออกเป็น 2 fractions นำ Fr.1 มาทำการตกผลึกซ้ำในเมธานอลจะได้สาร **3** (18.6 mg, 8.61%) ส่วน Fr.2 จะนำมาทำการแยกต่อด้วย preparative HPLC และชะคอลัมน์ด้วย methanol-water (80:20, v/v) จะได้สาร **2** (12.5 mg, 5.53%)

7.1.1 สาร 2

Light yellow solid; $[\alpha]_D^{23} +29.5$ (c 0.65, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 244.5 (4.52), 325 (4.29), 363 (4.08) nm; IR (neat) ν_{max} : 3435, 1633 cm^{-1} ; NMR spectroscopic data, ดูตารางที่ 1 และ 2. HRESIMS m/z 459.1662 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{24}H_{17}O_9$, 459.1661)

7.1.2 สาร 3

Yellowed-orange crystal; $[\alpha]_D^{23} +43.0$ (c 0.30, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 238.5 (4.32), 258 (4.18), 275 (4.15), 407.5 (4.23), 438 (4.27) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$: 3436, 1616 cm^{-1} ; NMR spectroscopic data, ดูตารางที่ 1 และ 2. HRESIMS m/z 441.1534 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{O}_8$, 441.1555)

การวิเคราะห์ X-ray crystallographic ของ สาร 3: Crystals of **3** obtained from slow solvent evaporation of MeOH belong to the triclinic space group $P1$ (no. 1) with unit cell dimensions $a = 6.6298(7) \text{ \AA}$, $b = 13.6701(17) \text{ \AA}$, $c = 14.0203(18) \text{ \AA}$, $\alpha = 74.571(5)^\circ$, $\beta = 82.283(6)^\circ$, $\gamma = 81.695(5)^\circ$, $V = 1205.9(3) \text{ \AA}^3$, $Z = 1$, $D_{\text{calc}} = 1.307 \text{ g cm}^{-3}$, $\text{C}_{49.50}\text{H}_{58}\text{O}_{18.50}$, $MW = 948.96$, $F(000) = 503$. A yellow-orange block-like single crystal of **1** with dimensions $0.10 \times 0.18 \times 0.20 \text{ mm}^3$ was mounted with epoxy glue on the tip of a glass fiber. X-ray diffraction experiment was performed at 298(2) K using a Bruker X8 APEX II Kappa CCD area-detector diffractometer with MoK α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). A total of 8,430 reflections were collected, integrated, reduced by SAINT+, corrected for Lorentz, polarization and absorption effects, and scaled by SADABS (Bruker Software Suite, APEX2, SAINT+ and SADABS. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA, 2005) to yield 4,226 unique reflections ($R_{\text{int}} = 0.024$). The structure was solved by direct methods and refined with full-matrix least squares on F^2 using SHELXL-97 [2]. The final $R_1(F^2) = 0.045$, $wR(F^2) = 0.112$ and $\text{Goof} = 1.012$ for 3,339 reflections with $F^2 > 2\sigma(F^2)$. Data have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC 945448). The asymmetric unit contains two molecules of **3**, 1.5 methanol and one water molecules; water H-atoms could not be located from difference Fourier electron density maps. Copies of these data can be obtained, free of charge, on application to the CCDC via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html (or 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK, fax: +44 1223 336033, e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk)

7.2 การแยกสารอนุพันธ์จากการบ่มสารแอลฟาแมงโกสตินกับเชื้อราไอโซเลต GM06

นำสารสกัดของปฏิกิริยาที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต GM06 (618 mg) มาแยกด้วย Sephadex LH-20 chromatography โดยใช้ตัวชะเป็น ethanol–water (50:50, v/v) จะสามารถแยกสารออกเป็น 2 fractions นำ Fr.1 มาทำการตกผลึกซ้ำในเมทานอลจะได้สาร **3** (18.6 mg, 8.61%) ส่วน Fr.2 จะนำมาทำการแยกต่อด้วย preparative HPLC และชะคอลัมน์ด้วย methanol–water (80:20, v/v) จะได้สาร **2** (12.5 mg, 5.53%)

7.3 การแยกสารอนุพันธ์จากการบ่มสารแอลฟาแมงโกสตินกับเชื้อราไอโซเลต K12

นำสารสกัดของปฏิกิริยาที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต K12 (2.6 g) มาแยกด้วย Sephadex LH-20 chromatography โดยใช้ตัวชะเป็น 100% methanol และทำซ้ำโดยการแยกด้วย Sephadex LH-20 chromatography โดยใช้ตัวชะเป็น 100% ethanol จะสามารถแยกสารออกเป็น 2 fractions นำ Fr.1 นำมาทำการแยกต่อด้วย preparative HPLC โดยการชะคอลัมน์ด้วย methanol–water

(80:20, v/v) จะได้ สาร **6** (4.4 mg, 2.05 %) ส่วน Fr.2 มาทำการแยกด้วย preparative HPLC เช่นเดียวกันโดยการชะคอลัมน์ด้วย 0.05% TFA ใน methanol–water (65:35, v/v) จะได้ สาร **4** (10.2 mg, 4.51%) และ สาร **5** (2.35 mg, 1.02%)

7.3.1. สาร **4**

Brown solid; $[\alpha]_D^{23} +26.7$ (c 0.52, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 242 (4.02), 255 (3.91), 318 (3.77), 355 (3.59), 453.5 (2.65) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$: 3436, 1632 cm^{-1} ; NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2. HRESIMS m/z 459.1639 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_9$, 459.1661).

7.3.2. สาร **5**

Yellow solid; $[\alpha]_D^{23} +87.7$ (c 0.06, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 240.5 (4.19), 258 (4.07), 317.5 (3.93), 447.5 (3.49) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$: 3437, 1641 cm^{-1} ; NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2. HRESIMS m/z 459.1643 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{O}_9$, 459.1661)

7.3.3 สาร **6**

Light yellow solid; $[\alpha]_D^{23} -63.2$ (c 0.22, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 244.5 (4.53), 319 (4.33), 353.5 (4.03) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$: 3435, 1630 cm^{-1} ; NMR spectroscopic data, see Tables 1 and 2. HRESIMS m/z 441.1551 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{O}_8$, 441.1555).

8 ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

8.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis*

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra ของสาร **1–6** ทดสอบด้วยวิธี green fluorescent protein microplate assay (GFPMA) [3] โดยความเข้มข้นสูงสุดของสารที่ทำทดสอบคือ 50 $\mu\text{g/ml}$ สารที่ใช้อ้างอิงแสดงค่า MIC เท่ากับ 0.36×10^{-2} – 1.46×10^{-2} และ 0.29–0.54 μM สำหรับ rifampicin และ streptomycin ตามลำดับ

8.2 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell line)

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell line) ทดสอบด้วยวิธี Resazurin Microplate assay [4] โดยความเข้มข้นสูงสุดของสารที่ทำทดสอบคือ 50 $\mu\text{g/ml}$ สารที่ใช้อ้างอิงแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 24.3 และ 17.5 μM สำหรับ tamoxifen และ doxorubicin ตามลำดับ

9 ทำการจำแนกชนิดของราที่ใช้ในการทดลอง

ราไอโซเลต GM02 GM06 และ K12 ถูกจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพ และลักษณะในการเพาะเลี้ยง ตามวิธีการของ Barnett and Hunter (1998) นอกจากนี้ยังใช้การเปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) 1 และ 2 รวมทั้งบริเวณ 5.8S rDNA

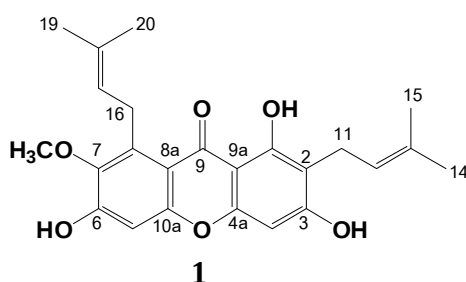
เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้วิธีการ BLAST search tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเราที่ใช้ในการทดลองนี้ถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูล EMBL ด้วย accession numbers

- HE863947 สำหรับ *Colletotrichum* sp.GM 02
- HE863948 สำหรับ *Xylaria* sp.GM 06
- HE863949 สำหรับ *P. euphorbiae* K12

ผลการทดลอง

1. การเตรียมสารแอลฟาแมงโกสติน

เมื่อนำสารแอลฟาแมงโกสตินที่แยกได้จากส่วนเปลือกของมังคุด ทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี และวิเคราะห์เพื่อยืนยันโครงสร้างด้วย NMR ได้ผลดังตารางที่ 1 เมื่อเทียบกับข้อมูลที่ได้มีรายงานไว้แล้ว [1] (Arunrattiyakorn et al., 2011) ยืนยันได้ว่าสารนี้เป็นสารแอลฟาแมงโกสติน มีโครงสร้างดังรูปที่ 1 เมื่อทดสอบด้วย HPLC เพื่อทดสอบความบริสุทธิ์ตามวิธีการของ Chaivishangkura et al., 2009 [5] พบว่าสารที่แยกได้มีความบริสุทธิ์มากกว่า 95 %



รูปที่ 1 โครงสร้างของสารแอลฟาแมงโกสติน

ตารางที่ 1 ข้อมูล NMR ของสารแอลฟาแมงโกสติน (สาร 1)

ตำแหน่งที่	δ_H	δ_C	ตำแหน่งที่	δ_H	δ_C
1	13.67 (s)	161.7	10a		156.8
2		111.6	11	3.27 (d, 7.3)	22.4
3		163.8	12	5.21 (m)	124.0
4	6.24 (s)	93.3	13		132.0
4a		156.3	14	1.66 (s)	26.1
5	6.27 (s)	102.9	15	1.78 (s)	18.1
6		158.0	16	4.06 (d, 5.4)	27.3
7		144.9	17	5.21 (m)	125.2
8		138.7	18		131.9
8a		112.3	19	1.67 (s)	27.3
9		183.3	20	1.83 (s)	18.5
9a		103.9	7-OMe	3.75 (s)	61.5

2. การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารแอลฟาแมงโกสทินด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์จากรา

จากการทดสอบเบื้องต้น พบว่า 3 ชนิดคือ ราไอโซเลต GM02 และ GM06 ที่แยกได้จากส่วนของใบมังคุด และ ราไอโซเลต K12 ที่แยกได้จากส่วนของใบมะกอกโอลีฟ โดยในการทดสอบเบื้องต้นแล้ววิเคราะห์ผลด้วย TLC พบว่าราทั้ง 3 ชนิดสามารถใช้สารแอลฟาแมงโกสทินเป็นสารตั้งต้น และทำให้เกิดอนุพันธ์ใหม่ขึ้นซึ่งอนุพันธ์ที่ได้จากราแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน (ค่า R_f จากการทดสอบ TLC แตกต่างกัน) จึงเลือกราทั้ง 3 ชนิดมาทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

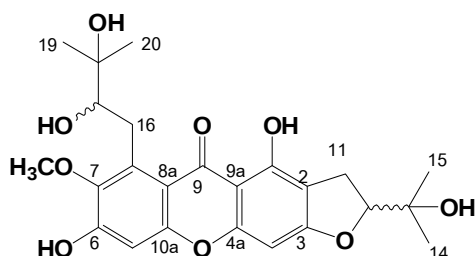
จากการทดสอบวิเคราะห์ชนิดของราพบว่า ราไอโซเลต GM02 GM06 และ K12 คือ *Colletotrichum* sp. *Xylaria* sp. และ *Phomopsis* sp. ตามลำดับ จึงกำหนดให้เรียกชื่อราที่ใช้ในการทดลองดังต่อไปนี้คือ *Colletotrichum* sp.GM02, *Xylaria* sp.GM06 และ *Phomopsis* sp.K12

จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารแอลฟาแมงโกสทินด้วยเอนไซม์จากราทั้ง 3 ชนิดที่คัดแยกได้ สามารถแยกอนุพันธ์ของแอลฟาแมงโกสทินได้ทั้งหมด 7 ชนิด โดยในที่นี้เป็นสารอนุพันธ์ 2 ชนิดที่ได้จากปฏิกิริยาของรา *Colletotrichum* sp.GM02 ซึ่งได้แก่ สาร 2 และ 3, ปฏิกิริยาจาก *Xylaria* sp.GM06 แยกอนุพันธ์ได้อีก 2 ชนิด และ ปฏิกิริยาจาก *Phomopsis* sp.K12 สามารถแยกอนุพันธ์ได้ 3 ชนิด คือ สาร 4 5 และ 6 อย่างไรก็ตาม ขณะนี้โครงสร้างของอนุพันธ์ 2 ชนิด ที่ได้จากปฏิกิริยาของรา *Xylaria* sp. นั้นยังไม่สามารถสรุปโครงสร้างได้

ในการวิเคราะห์โครงสร้างสาร คือ *Colletotrichum* sp. GM 02 ได้สารอนุพันธ์ใหม่ 2 ชนิด คือ 17,18-dihydroxymangostanin (สาร 2) และ cyclomangostanin (สาร 3) สำหรับปฏิกิริยาจากเชื้อ *Phomopsis* sp.K12 ได้สารอนุพันธ์ใหม่ 3 ชนิด คือ 12,13, 20-trihydroxymangostin (สาร 4), 12,13, 19-trihydroxymangostin (สาร 5) และ 20-hydroxymangostanin (สาร 6) สำหรับอนุพันธ์ที่แยกได้จากปฏิกิริยาของ *Xylaria* sp. GM 06 แยกได้ 2 ชนิด อย่างไรก็ตามโครงสร้างของสารทั้งสองยังไม่สามารถสรุปได้ในขณะนี้

สาร 2 เป็นของแข็งสีเหลือง มีสูตรโมเลกุลคือ C₂₄H₂₇O₉ ซึ่งคำนวณจากมวลโมเลกุลที่ได้จากการตรวจสอบด้วย HRESIMS (observed m/z. 459.1662; calcd. 459.1661) เมื่อเปรียบเทียบกับมวลโมเลกุลกับสารตั้งต้นแอลฟาแมงโกสทิน พบว่าสารใหม่ที่ได้มีจำนวน ออกซิเจนเพิ่มขึ้น 3 อะตอม และไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 2 อะตอม เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ ¹H และ ¹³C NMR ของสาร 2 และ สารตั้งต้น พบว่า ข้อแตกต่างที่เห็นได้ชัดคือ หมู่ข้างที่ติดกับคาร์บอน ตำแหน่งที่ C-2 และ C-8 ต่างกัน ซึ่งข้อมูลของสาร 2 แสดงให้เห็นสัญญาณของหมู่ 2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihydrofuran-3-ol ที่ δ_H 1.20 (3H, s, H-14), δ_H 1.25 (3H, s, H-15), δ_H 4.73 (1H, *t*-like, *J* = 8.4 Hz, H-12), δ_H 3.04 (2H, *d*, *J* = 8.4 Hz, H-11), δ_C 25.4 (C-14), δ_C 25.4 (C-15), (δ_C 72.5, C-13), δ_C 93.1 (C-12), δ_C 27.5 (C-11) รวมทั้งหมู่ 2,3-dihydroxy-3-methylbutyl จากสัญญาณที่ δ_H 1.28 (3H, s, H-19), δ_H 1.28 (3H, s, H-20), δ_H 3.60 (1H, *t*-like, *J* = 8.4 Hz, H-17), δ_H 3.43 (2H, *d*, *J* = 8.4 Hz, H-16), δ_C 29.7 (C-16), δ_C 80.6 (C-17), (δ_C 74.4, C-18), δ_C 25.5 (C-19), δ_C 26.0 (C-20) จากความสัมพันธ์ของ HMBC (H-11/C-1, C-2, C-3, C-12, C-13; H-12/C-2, C-3 C-11) และ COSY (H₂-11/H-12) ยืนยันได้ว่า หมู่ 2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihydrofuran-3-ol moiety อยู่ตรงตำแหน่ง C-2 และ C-3 สำหรับหมู่ A 2,3-dihydroxy-3-methylbutyl ต่ออยู่กับ C-8 ซึ่งได้ข้อมูลจากความสัมพันธ์ของ HMBC ระหว่าง H-16/ C-7, C-8, C-8a รวมถึง H-17/C-7, C-8, C-16 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหมู่พรีนิล (prenyl group) ที่ตำแหน่ง C-2 และ C-8 ในโครงสร้างของแอลฟาแมงโกสทิน ถูกแทนที่ด้วยหมู่ 1 2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihydrofuran-3-ol และ หมู่ 2,3-dihydroxy-3-methylbutyl moieties

ตามลำดับ ในโครงสร้างของสารที่ 2 เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูล NMR ของสาร 2 กับสาร magostanin และ mangostenone E แสดงให้เห็นว่า สาร 2 มี xanthone ring A เหมือนกับ magostanin และ xanthone ring B เหมือนกับ mangostenone E [6 และ 7] อย่างไรก็ตาม chiral center ที่ตำแหน่ง C-12 และ C-18 ยังไม่สามารถสรุปได้ในขณะนี้ ดังนั้นสาร 2 คือ 17,18-dihydroxymangostanin.



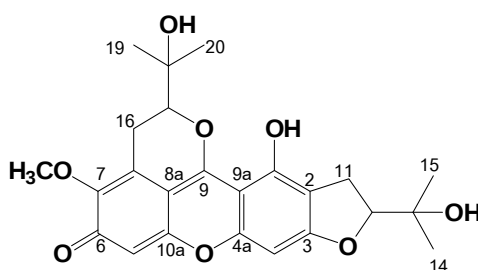
รูปที่ 2 โครงสร้างของสาร 2 17,18-dihydroxymangostanin

ตารางที่ 2 ข้อมูล NMR ของ 17,18-dihydroxymangostanin (สาร 2) (acetone d_6)

ตำแหน่งที่	δ_H	δ_C	ตำแหน่งที่	δ_H	δ_C
1	13.26 (s)	158.4	10a		158.6
2		109.2	11	3.04 (d, 8.4)	27.5
3		168.5	12	4.73 (t-like, 8.4)	93.1
4	6.14 (s)	89.3	13		72.5
4a		158.7	14	1.20 (s)	25.4
5	6.63 (s)	103.3	15	1.25 (s)	25.4
6		156.8	16	3.43 (d, 6.0)	29.7
7		146.1	17	3.60 (t-like, 6.0)	80.6
8		136.4	18		74.4
8a		112.7	19	1.28 (s)	26.0
9		183.9	20	1.28 (s)	25.5
9a		104.7	7-OMe	3.82 (s)	61.1

สาร 3 เป็นผลึกสีเหลืองส้ม ได้จากการตกผลึกในเมทานอล สูตรโมเลกุลคือ $C_{24}H_{26}O_8$ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วย HRESIMS (observed m/z . 441.1534; calcd. 441.1555) แสดงให้เห็นว่า สาร 2 มีการเพิ่มออกซิเจน 2 อะตอมในโมเลกุลของแอลฟาแมงโกสทิน ผลจาก 1H NMR ของสาร 3 (Table 1) แสดงให้เห็นสัญญาณของ hydroxyl proton at δ_H 8.49 (1H, s, OH-1) singlet protons 2 อะตอมที่ at δ_H 6.48 (1H, s, H-4) และ δ_H 6.41 (1H, s, H-5) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ methoxyl group 1 หมู่ที่ δ_H 3.80 (3H, s, 7OMe) และหมู่ 2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihydrofuran-3-ol ซึ่งหมู่นี้ได้จากการสังเกตสัญญาณของ 1H NMR ที่ δ_H 1.24 (3H, s, H-14), δ_H 1.30 (3H, s, H-15), δ_H 4.80 (1H, t-like, $J = 8.4$ Hz), H-12),)] δ_H 3.15 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-11) โดยวง dihydrofuran นี้ตั้งอยู่ที่

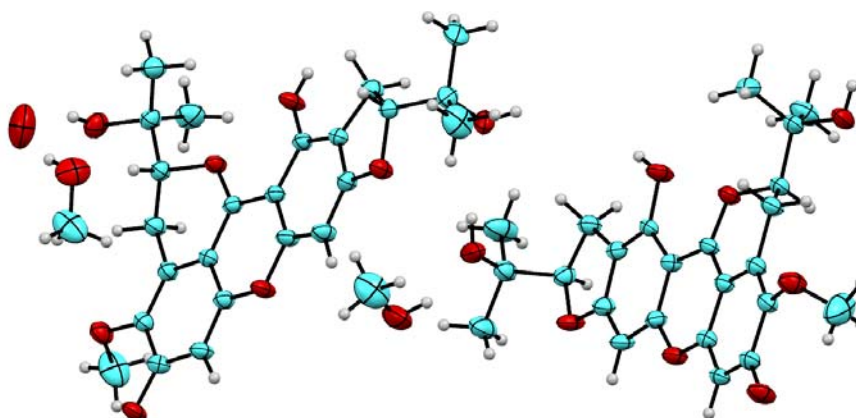
ตำแหน่ง C-2 and C-3 ในโครงสร้าง ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ HMBC จากความสัมพันธ์ระหว่าง H-11/C-1, C-2, C-3, C-12, C-13; และ H-12/C-2, C-3 C-11 รวมถึง COSY ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง H₂-11 และ H-12 โดยสัญญาณของ singlet protons ที่ δ_H 6.46 และ δ_H 6.38 เป็นสัญญาณของ H-4 และ H-5 ตามลำดับจากการสังเกตความสัมพันธ์ระหว่าง H-4/C-2, C-3, C-9a, C-9 และ H-5/C-6, C-7, C-8a, C-10a นอกจากนี้ ความสัมพันธ์ระหว่าง methoxyl proton ที่ δ_H 3.80 กับ C-7 แสดงให้เห็นว่า methoxyl group ต่ออยู่ที่ตำแหน่ง C-7 ในโครงสร้าง เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของ ¹H และ ¹³C NMR ของสาร **3** กับแอลฟาแมงโกสติน พบว่า C-1 hydroxy proton ในสาร **3** มีค่า chemical shift เท่ากับ 8.xx ขณะที่ chelated hydroxyl proton ที่ C-1 ในแอลฟาแมงโกสตินมีค่าเท่ากับ 13.92 ppm แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงของคาร์บอนิลที่ตำแหน่ง C-9 ในโครงสร้าง นอกจากนี้ค่า chemical shift ของ carbonyl carbon ในสารแอลฟาแมงโกสตินมีค่าเท่ากับ 183.3 ในขณะที่ในสาร **3** มีค่าเท่ากับ 176.7 ppm แสดงให้เห็นว่าเกิดการออกซิเดชันของหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-6 เป็นคาร์บอนิล นอกจากนี้ หมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง C-8 ควรจะเกิดการบิดงเพื่อให้ได้ 12 degrees of unsaturation และจำนวนของอะตอมออกซิเจนตามมวลโมเลกุลที่หาได้ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า หมู่แทนที่ที่ C-8 เป็นวง dihydropyran ที่ต่ออยู่กับหมู่ propan-2-ol โดย dihydropyran/propan-2-ol จะต่อกับ C-8 และ C-9 ของวง xanthone โดยใช้พันธะอีเทอร์ที่ C-9 การต่อของหมู่ propan-2-ol กับวง dihydropyran ring ที่ C17 ยืนยันด้วยผลของความสัมพันธ์ HMBC ระหว่าง H₃-19 และ H₃-20 กับ C-18 และ C-17 รวมทั้ง ความสัมพันธ์ระหว่าง H16/H17 ใน COSY ดังรูปที่ 2 นอกจากนั้น โครงสร้างของสาร **3** ยังยืนยันด้วยผลการทดสอบ X-ray crystallographic analysis ดังรูปที่ 3 ดังนั้น สาร **3** สรุปได้ว่าเป็น 12-hydroxy-2, 10-bis (2-hydroxypropan-2-yl) 4-methoxy-10,11-dihydro-2H-furo-[3,2-b] pyrano [4,3,2-kl] xanthenes-5(3H)-one หรือ cyclomangostanin ซึ่งเป็นสารที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน จากการศึกษาของผู้วิจัย พบว่า นี่เป็นรายงานแรกของโครงสร้างของสารธรรมชาติของสารกลุ่ม xanthone ที่มีโครงสร้างต่อกับ 2-(3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl)propan- 2-ol (ring D) จากการค้นหาโครงสร้างสาร พบว่า นี่เป็นสารธรรมชาติชนิดแรกที่มีโครงสร้างของ 3,5-dihydro-2H-pyrano [4,3,2-kl] xanthene ดังรูปที่ 3 ส่วน bicyclomangostin เป็นสารที่ได้จากปฏิกิริยาการบิดงที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของแอลฟาแมงโกสตินกับกรด [8]



รูปที่ 3 โครงสร้างของสาร **3** cyclomangostanin

ตารางที่ 3 ข้อมูล NMR ของ cyclomangostanin (สาร 3) (acetone d_6)

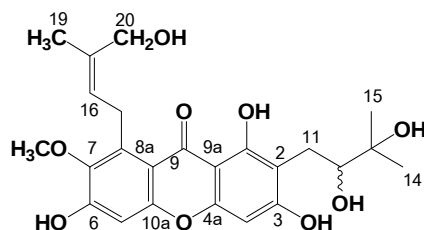
ตำแหน่ง ที่	δ_H	δ_C	ตำแหน่ง ที่	δ_H	δ_C
1	8.49 (s)	156.6	10a		158.3
2		112.4	11	3.15 (d, 8.7)	28.0
3		169.5	12	4.80 (overlapped with solvent)	93.4
4	6.48 (s)	91.3	13		72.3
4a		159.4	14	1.24 (s)	25.4
5	6.41 (s)	104.1	15	1.30 (s)	25.4
6		176.5	16	2.99 (dd, 13.2, 16.8) 3.40 (dd, 3.0, 16.8)	22.6
7		148.3	17	4.45 (dd, 3.0, 13.2)	88.6
8		124.3	18		72.1
8a		100.6	19	1.41 (s)	25.4
9		166.3	20	1.52 (s)	26.1
9a		101.1	7-OMe	3.84 (s)	60.6



รูปที่ 4 ORTEP-3 plot ของสาร 3

สาร 4 เป็นของแข็งสีน้ำตาล มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{24}H_{28}O_9$ ซึ่งได้จากการทดสอบมวลโมเลกุลด้วย HREIMS [m/z 459.1636 [$M-H$]⁻ (calcd 459.1661)] สาร 4 มีมวลโมเลกุลเท่ากับสาร 2 โดยข้อมูลของ 1H and ^{13}C NMR ของสาร 4 (ตารางที่ 4) นั้นเหมือนกับข้อมูล NMR ของสารตั้งต้น 1 ยกเว้นสัญญาณของสายโซ่ข้างของโมเลกุลที่ C-2 และ C-8 โดยโซ่ข้างที่ C-2 นั้นแสดงให้เห็นว่าเป็นหมู่ 2,3-dihydroxy-3-methyl butyl จากการวิเคราะห์ด้วยลักษณะข้อมูลของ 1H and ^{13}C NMR ดังนี้คือ δ_H 3.23 (1H, m, H-11a), 2.58 (1H, m, H-11b), 3.65 (1H, m, H-12), 1.26 (3H, s, H-14), 1.29 (3H, s, H-15) และ δ_C 25.8(C-11), 80.9(C-12), 73.0 (C-13), 25.0 (C-14), 26.1 (C-15) โดยตำแหน่งของหมู่ 2,3-dihydroxy-3-methyl butyl ที่ต่อกับ C-2 ยืนยันได้จากความสัมพันธ์จาก HMBC ของ H-11/C-1, C-2,

C-3, C-12 มากกว่านี้ หมู่ prenyl ที่ C-8 นั้นวิเคราะห์จากผลของข้อมูล ^1H and ^{13}C NMR ดังนี้คือ δ_{H} 4.15 (2H, m, H-16), 5.38 (1H, m, H-17), 1.73 (3H, s, H-19), 4.33 (2H, s, H-20) and δ_{C} 26.4(C-16), 126.3(C-17), 136.3 (C-18), 21.7 (C-19), 61.7 (C-20) อย่างไรก็ตาม มีหมู่เมทิลหนึ่งหมู่ของโซ่ข้าง prenyl นี้ที่ถูก hydroxylated ไปเป็นหมู่ hydroxymethylene ซึ่งยืนยันจาก ค่า chemical shift ของ methylene carbon ที่ δ_{C} 61.7 (C-20) ซึ่งจาก HMBC นั้น คาร์บอนนี้สัมพันธ์กับ two-proton resonance ที่ δ_{H} 4.33 (H₂-C19) จากความสัมพันธ์ระหว่าง H-16/C-7, C-8, C-8a, C-17 ใน HMBC เป็นการยืนยันได้ว่า หมู่ 4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl นั้นอยู่ที่ตำแหน่ง C-8 จากการวิเคราะห์ด้วย NOESY ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง H19/H17 และ H20/H16 แสดงให้เห็นว่า พันธะคู่ของหมู่ isoprenyl ที่ตำแหน่ง C-8 อยู่ในรูปของ Z-configuration ซึ่งข้อมูลนี้ถูกสนับสนุนด้วยค่า chemical shift ของ vinyl methyl carbon ที่ C-19 (21.xx) โดยสัญญาณของ methyl ในรูปของ E-configuration จะปรากฏค่าที่ high field ($\delta_{\text{C}} < 18$) เนื่องจากผลของการเพิ่ม γ effect (Vo et al., 2012). ดังนั้น สาร **4** คือ 12,13,20-trihydroxymangostin

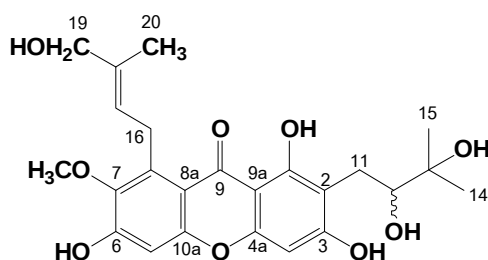


รูปที่ 5 โครงสร้างของสาร **4** (12,13,20-trihydroxymangostin)

ตารางที่ 4 ข้อมูล NMR ของ 12,13,20-trihydroxymangostin (สาร **4**) (acetone d_6)

ตำแหน่ง ที่	δ_{H}	δ_{C}	ตำแหน่ง ที่	δ_{H}	δ_{C}
1	13.92 (s)	162.0	10a		156.4
2		110.1	11	2.59 (dd, 9.6, 14.4) 3.23 (d, 14.4)	25.8
3		164.9	12	3.65 (d, 9.6)	80.9
4	6.33 (s)	94.6	13		73.0
4a		156.3	14	1.26 (s)	25.0
5	6.85 (s)	103.1	15	1.29 (s)	26.1
6		157.7	16	4.15 (d, 11.7)	26.4
7		144.7	17	5.38 (t-like, 10.3, 6.6)	126.3
8		137.7	18		136.6
8a		112.0	19	1.74 (s)	21.7
9		183.0	20	4.33 (s)	61.7
9a		103.7	7-OMe	3.82 (s)	61.6

สาร 5 เป็นของแข็งสีเหลือง มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{24}H_{28}O_9$ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วย HREIMS [m/z 459.1643 $[M-H]^-$ (calcd 459.1661) สาร 5 นี้มีมวลเท่ากับสาร 4 จากการเปรียบเทียบข้อมูล 1H and ^{13}C NMR ของสาร 5 กับ สาร 4 แสดงให้เห็นว่า สารทั้งสองนั้นมีโครงสร้างเป็นแอนนาลอกซึ่งกันและกัน ซึ่งมีความแตกต่างกันเพียงค่า chemical shifts ของ C-19 และ C-20 (ตารางที่ 5) โดย geometry ของพันธะคู่ของหมู่ prenyl ที่ตำแหน่ง C-8 นั้นสรุปได้ว่าเป็น *E* โดย chemical shift ของ vinyl methyl ซึ่งมีค่าต่ำกว่า δ_C 18 (อันเนื่องมาจาก γ effect) (Vo et al., 2012) ความสัมพันธ์ของ H19/H17 และ H20/H16 จากการทดสอบ NOE ยืนยันได้ว่า พันธะคู่ที่ C-17/C-18 ของหมู่ 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl นี้อยู่ในรูป *E* isomer ดังนั้น สาร 5 คือ 12,13,19-trihydroxymangostin (5)



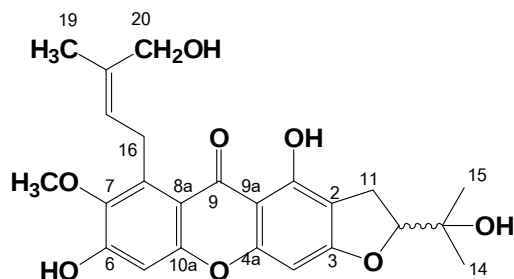
รูปที่ 6 โครงสร้างของสาร 5 (12,13,19-trihydroxymangostin)

ตารางที่ 5 ข้อมูล NMR ของ 12,13,19-trihydroxymangostin (สาร 5) (acetone d_6)

ตำแหน่งที่	δ_H	δ_C	ตำแหน่งที่	δ_H	δ_C
1	14.00	162.0	10a		156.4
2		110.1	11	2.58, 3.22 (<i>d</i> , 7.2)	25.8
3		164.9	12	3.63 (<i>m</i>)	80.9
4	6.35 (<i>s</i>)	94.6	13		73.0
4a		156.3	14	1.25 (<i>s</i>)	25.0
5	6.88 (<i>s</i>)	103.1	15	1.28 (<i>s</i>)	26.1
6		157.7	16	4.17 (<i>d</i> , 5.4)	26.4
7		144.7	17	5.53 (<i>m</i>)	126.3
8		137.7	18		136.6
8a		112.0	19	1.85 (<i>s</i>)	21.7
9		183.0	20	3.90 (<i>s</i>)	61.7
9a		103.7	7-OMe	3.77 (<i>s</i>)	61.6

สาร 6 เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{24}H_{26}O_8$ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วย HREIMS [m/z 441.1551 $[M-H]^-$ (calcd 441.1555) ซึ่งสารนี้มีมวลโมเลกุลต่ำกว่าสาร 4 อยู่ 18 mass unit จากการวิเคราะห์ข้อมูล 1H and ^{13}C NMR ของสาร 6 และ 4 แสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองมีความเหมือนกันอย่างมาก (ตารางที่ 6 และ 4) ซึ่งจากการสังเกตส่วนที่ต่างกันคือโซ่ข้างที่ C-2 และ C-3, โดย

จากข้อมูล ^1H NMR ของสาร **6** แสดงสัญญาณของ 2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihydrofuran-3-ol moiety ดังข้อมูลต่อไปนี้ δ_{H} 1.24 (3H, s, H-14), δ_{H} 1.28 (3H, s, H-15), δ_{H} 4.81 (1H, *t*-like, $J = 8.4$ Hz, H-12), δ_{H} 3.16, 3.08 (2H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-11) แทนที่หมู่ 2,3-dihydroxy-3-methyl butyl ที่ตำแหน่ง C-2 และหมู่ free hydroxyl ที่ตำแหน่ง C-3 ในสาร **4** ซึ่งข้อมูลที่ได้สัมพันธ์กับข้อมูลจากความสัมพันธ์ HMBC ดังนี้คือ H-11/C-1, C-2, C-3, C-12, C-13; H-12/C-2, C-3 C-11 ดังนั้นสาร **6** คือ 20-hydroxymangostanin



รูปที่ 7 โครงสร้างของสาร **6** (20-hydroxymangostanin)

ตารางที่ 6 ข้อมูล NMR ของ 20-hydroxymangostanin (สาร **6**) (acetone d_6)

ตำแหน่งที่	δ_{H}	δ_{C}	ตำแหน่งที่	δ_{H}	δ_{C}
1	13.63(s)	154.5	10a		157.7
2		116.1	11	3.08, 3.16 (<i>d</i> , 8.4)	29.2
3		161.6	12	4.81 (<i>t</i> -like, 8.4)	94.5
4	6.25 (s)	101.7	13		73.2
4a		157.1	14	1.24 (s)	22.9
5	6.85 (s)	103.0	15	1.28 (s)	25.4
6		158.9	16	4.16 (<i>d</i> , 5.1)	27.4
7		145.4	17	5.36 (<i>m</i>)	125.4
8		138.7	18		131.8
8a		113.6	19	4.32 (s)	18.4
9		178.7	20	1.73 (s)	26.1
9a		107.4	7-OMe	3.80 (s)	61.4

5 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพ เมื่อนำอนุพันธ์ทั้ง 7 ชนิดที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อวัณโรคและต้านมะเร็ง พบว่า

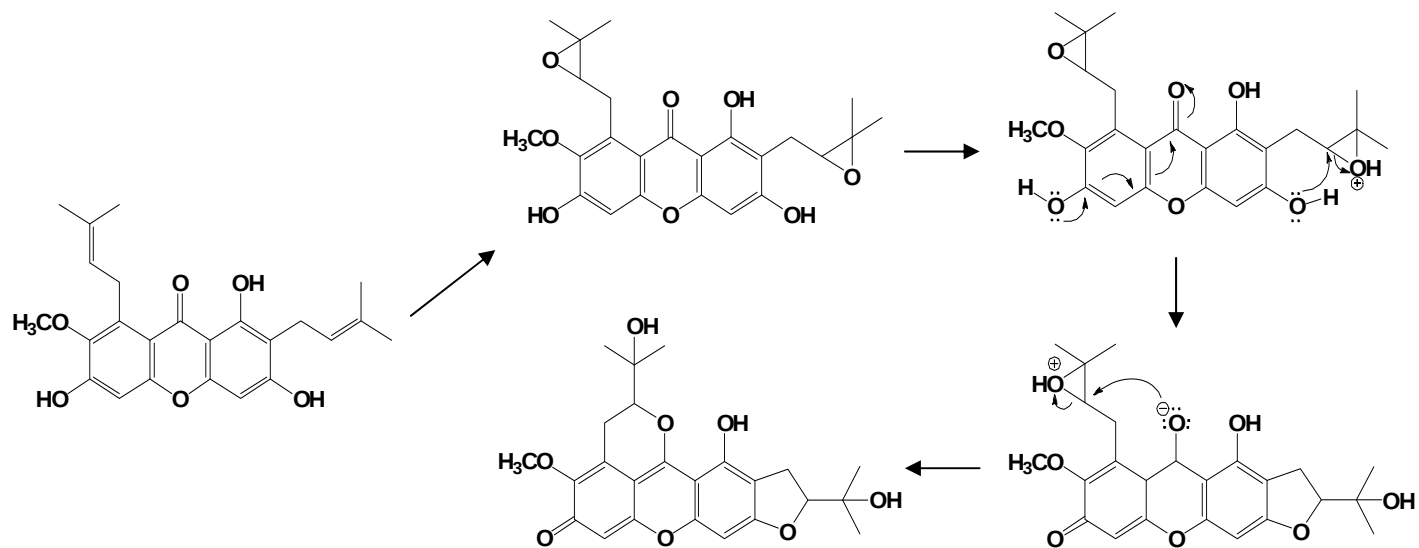
5.1 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) สารแอลฟาแมงโกสทินมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อวัณโรคด้วย MIC 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนอนุพันธ์ **2-6** พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อวัณโรค ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 ฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเต้านม (MCF7 cell line) สารอนุพันธ์ **2, 3, 6** พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารที่ **4**

และ 5 มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเต้านมเล็กน้อยคือ IC 50 เท่ากับ 38.57 และ 38.52 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารแอลฟาแมงโกสตินด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์จากรา *Colletotrichum* sp. GM02 และ *Xylaria* sp. GM06 ที่แยกได้จากใบของมังคุด และ *Phomopsis euphorbiae* K12 ที่แยกได้จากใบของมะกอก ทำให้ได้สารอนุพันธ์ของแอลฟาแมงโกสตินทั้งหมด 7 ชนิด สามารถหาโครงสร้างที่สมบูรณ์ได้ 5 ชนิด และอีก 2 ชนิดยังไม่สามารถสรุปโครงสร้างได้ในขณะนี้ โดยสาร 5 ชนิดที่สามารถหาโครงสร้างได้แล้ว เป็นสารชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน
2. เมื่อพิจารณาถึงกระบวนการในการเกิดไบโอทรานฟอร์มเมชันของสารแอลฟาแมงโกสตินพบว่าปฏิกิริยาส่วนใหญ่จะเกิดตรง ตำแหน่งของสายโซ่พรีนิลทั้งสองหมู่ในโครงสร้างของแอลฟาแมงโกสติน ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้แก่
 - การเกิดออกซิเดชันตรงพันธะคู่ของหมู่พรีนิล ได้เป็นสารตัวกลางอีพอกไซด์และได้เป็นอนุพันธ์ไกลคอลตามลำดับ ดังที่พบในโครงสร้างของสาร 2, 4 และ 5
 - การเกิดออกซิเดชันตรงพันธะคู่ของหมู่พรีนิลได้เป็นสารตัวกลางอีพอกไซด์ จากนั้นทำให้เกิดการปัดวงกับหมู่ไฮดรอกซิลข้างเคียง เกิดเป็นวงฟูแรน ดังที่พบในโครงสร้างของสาร 2, 3 และ 6 หรือวงไพแรน ดังที่พบในโครงสร้างของสาร 3
 - การเกิดไฮดรอกซิเลชันของหมู่เมทิลในสายโซ่พรีนิล ได้เป็นไฮดรอกซีเมทิลพรีนิล ดังที่พบในโครงสร้างของสาร 4 5 และ 6
3. เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาการเกิดสารอนุพันธ์ สาร 3 คาดว่าการเกิดการปัดวงเป็นวงไพแรนได้นั้นเกิดจากการเกิดออกซิเดชันของหมู่พรีนิลตรง C17-18 จากนั้นเกิดการ tautomerization ทำให้หมู่ไฮดรอกซิลที่ C-6 เกิดเป็นคาร์บอนิล และเกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนมายังหมู่คาร์บอนิลที่ C-9 ทำให้แสดงลักษณะเป็นหมู่ที่มีจำนวนอิเล็กตรอนเกิน ดังนั้นอิเล็กตรอนจึงเข้าทำปฏิกิริยาตรงตำแหน่งอีพอกไซด์ที่ C-17-18 เกิดการปัดวงเป็นวงไพแรนได้ ดังรูปที่ 8
4. จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าทุกอนุพันธ์ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อวัณโรคและต้านมะเร็งเต้านม ยกเว้นสาร 4 และ 6 มีฤทธิ์เล็กน้อยในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม จากโครงสร้างอาจมองได้ว่า หมู่พรีนิลที่ตำแหน่ง C-2 และ C-8 รวมทั้งหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-1, C-3 และ C-6 มีความสำคัญในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ



รูปที่ 8 แสดงขั้นตอนที่คาดว่าเป็นขั้นตอนของการเกิดสาร 3

เอกสารอ้างอิง

1. Arunrattiyakorn, P., Suksamrarn, S., Suwannasai, N., Kanzaki, H. 2011. Microbial metabolism of α -mangostin isolated from *Garcinia mangostana* L. *Phytochemistry* 72, 730–734.
2. Sheldrick, G.M. 2008. Foundations of crystallography. *Acta Cryst. A* 64, 112–122.
3. Changsen, C., Franzblau, S.G., Palittapongarnpim, P., 2003. Improved green fluorescent protein reporter gene-based microplate screening for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3682–3687
4. Brien, J.O., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 267, 5421–5426.
5. Chaivishangkura, A., Malaikaew, Y., Chaovanalikit, A., Jaratrungtawee, A., Panseeta, P., Ratananukul, P., Suksamrarn, S., 2009. Prenylated xanthone composition of the *Garcinia mangostana* (mangosteen) fruit hull. *Chromatographia* 69, 315–318
6. Nilar and L. J. Harrison. 2002. Xanthenes from the heartwood of *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* 60, 541–548
7. Suksamrarn, S., Komutiban, O., Ratananukul, P., Chimnoi, N., Lartpornmatulee, N., Suksamrarn, A. 2006. Cytotoxic Prenylated Xanthenes from the Young Fruit of *Garcinia mangostana*. *Chem. Pharm. Bull.* 54, 301–305.
8. Mahabusarakam, W., Proudfoot, J., Taylor, W., Croft, K. 2000. Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthenes derived from mangostin. *Free. Rad. Res.* 33, 643–659.

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. เนื่องจากในงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถหาโครงสร้างที่สมบูรณ์ของสารที่ 7 และ 8 ได้ จากการทดลองพบว่าสารนี้ไม่สามารถตกผลึกได้ การเตรียมอนุพันธ์ก็ไม่เสถียร จึงต้องหาวิธีการในการเตรียมอนุพันธ์อื่นที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมผลึกในการวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วย X-ray diffraction ต่อไป
2. จากการศึกษาอย่างต่อเนื่องในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้วยปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ ทำให้พบว่าวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ดีในการสังเคราะห์สารชนิดใหม่ แม้ในครั้งนี้น้ำสารที่ได้จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ลดลง แต่เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยจึงไม่อาจทำการทดสอบฤทธิ์ชนิดอื่นๆ ได้อีก แต่อย่างไรก็ตามโครงสร้างของสารที่ได้จากการทดลองนี้มีความแปลกใหม่ ทำให้ได้พบวิถีใหม่ๆ ในการสังเคราะห์สารจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จากรา ดังนั้นต่อไปคาดว่าจะเลือกทำปฏิกิริยากับสารออกฤทธิ์ชนิดอื่นที่นอกเหนือจากแอลฟาแมงโกสติน หรือการทำปฏิกิริยากับสารแอลฟาแมงโกสติน แต่เลือกใช้ราหรือแบคทีเรียหรือจุลชีพอื่นๆ ต่อไป

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ อยู่ระหว่างรอผลการพิจารณาการตีพิมพ์
Arunrattiyakorn P, Suwannasai N, Aree T, Kanokmedhakul S, Ito H, Kanzaki H.
Biotransformation of α -mangostin by *Colletotrichum* sp. MT02 and *Phomopsis euphorbiae* K12. Submission (Journal of Molecular catalysis B: Enzyme)
2. เสนอผลงานแบบปากเปล่าในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ
 - 2.1 Arunrattiyakorn P, Suksumrarn S, Suwannasai N, and Kanzaki H. Microbial transformation of α -mangostin. The 3rd Satellite Seminar of the Asian Core Program from 17-18 November 2010 in Ho Chi Minh City, Vietnam. (วิทยากรรับเชิญ)
 - 2.2 Arunrattiyakorn P, Suksumrarn S, Suwannasai N, and Kanzaki H. Microbial transformation of α -mangostin by four endophytic fungi. The 5th Young Scientist Seminar 2011 in Asian Core Program entitled "Capacity building and development of microbial potential and fermentation technology towards new era" and in JENESYS Program, entitled "Collaborative research on development of useful microbial resources in tropical environments with Southeast Asia young researchers" from 22-23th November 2011 Seminar Park, Yamaguchi, Japan (วิทยากรรับเชิญ)
 - 2.3 Arunrattiyakorn P, Suksumrarn S, Suwannasai N, Kanokmedhakul S, and Kanzaki H. Biotransformation of alpha-Mangostin by Endophytic Fungi. The Final Joint Seminar of Asian Core Program on CAPACITY BUILDING AND DEVELOPMENT OF MICROBIAL POTENTIAL AND FERMENTATION TECHNOLOGY TOWARDS NEW ERA. 18 – 20 November 2012, Kaikyo Messe Shimonoseki, Shimonoseki, Yamaguchi, JAPAN